

CULTIVATION TOOL AND ITS PRODUCTION

Patent number: JP6090738
Publication date: 1994-04-05
Inventor: YOKOYAMA KANEHISA; others: 02
Applicant: SUMITOMO BAKELITE CO LTD
Classification:
- **International:** C12M3/00; C08J7/12
- **European:**
Application number: JP19920243522 19920911

Abstract of JP6090738

PURPOSE: To provide a cultivation tool enabling long-term storage and sterilization, keeping the effect of positive charge in a long-term cultivation and capable of keeping the form and function of cell in the primary culture and the culture of nervous cells.

CONSTITUTION: A substrate having hydroxyl group on the surface or subjected to surface-treatment to introduce hydroxyl group to the surface is used as the starting material of the tool. The surface of the substrate is reacted with a primary aminosilane coupling agent to form a primary aminosilane (having an amino group density of 0.1-2nmol/cm²) on the culture surface.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-90738

(43) 公開日 平成6年(1994)4月5日

| (51) Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|------|---------|-----|--------|
| C 1 2 M 3/00 | Z | | | |
| C 0 8 J 7/12 | | 7310-4F | | |

審査請求 未請求 請求項の数2 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平4-243522

(22) 出願日 平成4年(1992)9月11日

(71) 出願人 000002141

住友ベークライト株式会社
東京都千代田区内幸町1丁目2番2号

(72) 発明者 横山 兼久

秋田市土崎港相築町字中島下27-4 住ベ
メディカル株式会社内

(72) 発明者 斧原 正幸

東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 住
友ベークライト株式会社内

(72) 発明者 菅原 順子

東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 住
友ベークライト株式会社内

(54) 【発明の名称】 培養用器具及びその製造方法

(57) 【要約】

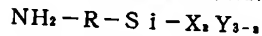
【目的】 長期保存と滅菌が可能で、かつ長期培養時において陽電荷の効果が持続し、初代培養、神経系細胞の培養において細胞形態、機能維持が良好な培養用器具を提供する。

【構成】 表面に水酸基を有するか、または表面処理により水酸基を導入した基材表面に、1級アミノシランカップリング剤を反応させて、培養面に1級アミノシラン(アミノ基密度0.1~2nmol/cm²)を形成させる。

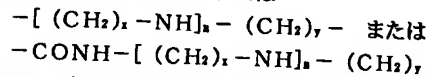
【特許請求の範囲】

【請求項1】 水酸基を有する基材表面に1級アミノシランを形成させて、 $0.1 \sim 2 \text{ nmol/cm}^2$ の密度のアミノ基を導入し、陽電荷を付与したことを特徴とする培養用器具。

【請求項2】 表面に水酸基を有するか、もしくは、予め物理化学的手段による酸化処理で水酸基を導入したプラスチック成形品の表面に、一般式



(式中、X及びYはアルコキシ基又はクロル基、アセトキシ基、アセチルアミノ基、プロペノキシ基等の加水分解性基、nは2又は3、Rは



x, yはそれぞれ0または20以下の整数、mは0または10以下の整数である。)で表される1級アミノシランカップリング剤を反応させて、該成形品の表面に1級アミノシランを形成させることにより、基材表面に陽電荷を付与することを特徴とする培養用器具の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、基材表面に陽電荷を付与した、細胞の初代培養や神経系細胞の培養に適した培養用容器、及びその製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】一般に市販されているシャーレ、フラスコ、マルチプレート等の細胞培養器具は、主としてポリスチレン成形品の表面に低温プラズマ処理、コロナ放電処理等を施し、親水性を付与したものである。これらの細胞培養器具は、足場依存性の細胞は、株化細胞、初代細胞を問わず、線維芽細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、角膜細胞等の培養に広く用いられている。又、血液系細胞として、株化したリンパ球であるNS-1、MOLT-4、HUT 78、MT-4、Jurkat等、いわゆる足場非依存性の浮遊細胞等にも広く使用されている。

【0003】しかし、細胞の種類によっては、これらの細胞培養器具上では細胞の接着や増殖は認められるものの、細胞の接着伸展が悪かったり、増殖形態が悪かったりする。特に、初代培養においてはそれが顕著である。そこで、細胞の接着伸展及び増殖促進の目的でコラーゲン、ゼラチンといった細胞外マトリックスやファイブロネクチン、ラミニン、ヒトロネクチンといった接着因子等を培養面にコートし、細胞の接着性、増殖性を付与したりする。

【0004】また、細胞の初代培養における3次元培養や神経系細胞初代培養においては、基材表面をプラスにチャージ、即ち陽電荷を付与すると細胞の機能維持に有効であることが分かってきており、神経系細胞の初代培養には、予め基材表面にポリリジン、ポリオルニチン、

ポリエチレンイミン等をコートしたり、アンモニアプラズマによりアミノ基等を導入して基材表面をプラスにチャージさせた培養容器が使用されている。又、ラットの肝細胞の初代培養においては細胞塊を形成し、それにより細胞の機能が高まるという報告もある。

【0005】しかし、ポリリジンやポリオルニチンは安定性が悪く、普通、コート後の有効期間は室温で2週間、冷蔵で1カ月程度である。また上記のような不安定さからも判るように、コート後滅菌を施すことが出来ないため、無菌的な操作によりコートをしなければならない。そのため、主に神経系細胞の培養を目的として、コマーシャルベースでポリリジンやポリオルニチンをコートした培養用容器を販売しようとした場合、生産面及び流通面でのコストが高くつくことになる。

【0006】ポリエチレンイミンもポリリジンやポリオルニチンの代替としてコートされるが、ポリエチレンイミンは細胞毒性が強く、吸着後の洗浄を念入りに行わないと、培養中にポリエチレンイミンが培地中に解け出し、細胞に悪い影響を与えることになる。

【0007】上記のポリリジン、ポリオルニチン、ポリエチレンイミンはいずれも、コート方法は吸着方法であり、基材に吸着させただけであるから長期間培養した場合にはコート物が基材より解け出し、効力が薄れてくる。長期に亘り培養した場合、その効果は2週間程度である。

【0008】そこで、このような解け出しによる効力の減退を少なくする目的や安定性付与の目的で、アンモニアプラズマにより基材表面にアミノ基を導入した培養容器もあるが、神経系細胞の初代培養においては、細胞の初期接着性は、上記のポリリジン、ポリオルニチン、ポリエチレンイミンコートと同等であるが、長期培養における細胞の形態維持効果は不十分であり、むしろ劣る。また、アンモニアプラズマによる処理を行う場合、プラズマ処理装置のチャンバーを腐食させる問題がある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、基材表面に陽電荷を持たせ、かつそれが安定で滅菌が可能であり、細胞の初代培養や神経系細胞の培養において、細胞の機能及び形態を長期にわたり維持できる培養用器具を提供することを目的とするものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、本発明者らは、基材表面に1級アミノシランを形成させると、神経突起の伸長が良好であり、その効果は長期培養においても維持し、かつ長期保存してもその効果が失われず、しかも、処理後滅菌を施しても効果が変わらないことを見だし、また、ラット肝細胞の初代培養においては細胞塊を形成し、その機能が長期にわたり接続することを見だし、本発明を完成するに至った。

3

【0011】即ち本発明は、表面に水酸基を有するか、もしくは予め物理化学的手段による酸化処理により水酸基を導入したプラスチック成形品の表面に、一般式

$\text{NH}_2-\text{R}-\text{Si}-\text{X}_n\text{Y}_{3-n}$
(式中、X及びYはアルコキシ基又はクロル基、アセトキシ基、アセチルアミノ基、プロペノキシ基等の加水分解性基、nは2又は3、Rは

$-(\text{CH}_2)_x-\text{NH}-(\text{CH}_2)_y-$ または
 $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_x-\text{NH}-(\text{CH}_2)_y-$
x, yはそれぞれ0または20以下の整数、mは0または10以下の整数である。)で表される1級アミノシランカップリング剤を反応させて、該成形品の表面に1級アミノシランを形成させ、0.1~2nmol/cm²の密度のアミノ基を導入し、陽電荷を付与したことを特徴とする培養用器具、及びその製造方法である。

【0012】本発明において使用する基材の種類は特に限定しないが、ハンドリング等を考慮した場合、プラスチックであることが望ましい。また、細胞培養の過程で顕微鏡により観察する必要があることから、透明であることが必要で、このような条件に適したプラスチック材料としては、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリエステル樹脂、TPX樹脂等が挙げられる。

【0013】また、ガラスやポリビニルアセテート共重合体のケン化物のようにそれ自身が水酸基を有するものはそのまま使用できるが、表面に所要量の水酸基を持たないプラスチック成形品では、酸化処理等の方法により水酸基を導入することが必要である。そのための物理化学的酸化処理方法としては、紫外線照射、電子線照射、γ線照射、コロナ放電、低周波又は高周波低温プラズマ放電処理等があるが、この中でも簡便且つ形状に制限されなくて、酸化反応試薬の廃棄処理に問題がなく、且つ水酸基の導入密度を調節しやすい低周波又は高周波低温プラズマ放電処理が望ましい。

【0014】本発明に用いる1級アミノシランカップリング剤としては、一般式

$\text{NH}_2-\text{R}-\text{Si}-\text{X}_n\text{Y}_{3-n}$
(式中、X及びYはアルコキシ基又はクロル基、アセトキシ基、アセチルアミノ基、プロペノキシ基等の加水分解性基、nは2又は3、Rは

$-(\text{CH}_2)_x-\text{NH}-(\text{CH}_2)_y-$ または
 $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_x-\text{NH}-(\text{CH}_2)_y-$
x, yはそれぞれ0または20以下の整数、mは0または10以下の整数である。)で表わされ、例えば、γ-アミノプロピルトリメトキシシラン、N-β(アミノメチル)γ-アミノプロピルトリメトキシシラン、γ-(ジエチレントリアミノ)プロピルトリメトキシシラン、γ-ウレイドプロピルトリメトキシシラン等が好適な例として挙げられるが、加水分解性基であるトリメトキシシランの代わりにトリエトキシシラン、メチルジメトキシシラン、エチルジエトキシシランの他、トリクロ

4

ル基、トリアセトキシ基等の誘導体でも有効である。

【0015】基材表面の水酸基と1級アミノシランカップリング剤との縮合反応により、基材表面に1級アミノシランを導入する方法としては、例えば上述のアミノシランカップリング剤をメタノール、エタノール、アセトン、水等を単独又は混合溶媒中0.1%~98重量%の割合に希釈し、5分~72時間、好ましくは水:メタノールの割合が0~80:100~20の溶媒に1~50重量%の割合に希釈し、1~48時間浸漬又は注加して反応させた後、蒸留水又は、緩衝液で水洗いすればよく、反応温度は、4℃~65℃、好ましくは24℃~60℃がよい。

【0016】上記条件によると基材表面には0.1~2nmol/cm²の密度でアミノ基が導入され、神経系細胞の培養においてその形態は良好となる。アミノ基の密度が0.1nmol/cm²より少ないと陽電荷の効果が現れず、又、2nmol/cm²より多いと前述した側鎖の効果が現れなくなり好ましくない。

【0017】

【作用】本発明における培養用器具は、1級アミノシランカップリング剤により培養面に陽電荷を付与するのが特徴である。低温アンモニアプラズマ等で基材表面に直接アミノ基を導入した場合に比べて、1級アミノシランのように基材より側鎖を介してその先端に結合されたアミノ基を導入することにより、陽電荷を付与すると、神経系細胞は良好な形態を長期にわたり維持することが出来、ラット肝細胞の初代培養においては良好な細胞塊を形成する。

【0018】また、ポリリジン等は基材表面への吸着によるものであり、長期間の培養時には培地中に解け出して、その効果は徐々に減衰する。これに対して、1級アミノシランカップリング剤を反応させた場合、1級アミノシランは基材表面と共有結合しているため、長期培養時でも解け出すことはなく、長期にわたって効果を維持することができる。また、一旦共有結合したアミノシランは安定であり、室温で長期にわたり保存してもその効果が失活することはない。

【0019】1級アミノシランカップリング剤により、基材表面にアミノ基を導入すること自体は新しいことではなく、例えば、免疫学的測定用担体の製造に適用した例が知られている(特開昭60-15560号公報)。しかしながら、ここではアミノ基は、グルタルアルデヒドとの化学的反応によって、基材表面に抗原または抗体を固定するための官能基として機能している。これに対して本発明においては、アミノ基は官能基としてではなく、基材表面に陽電荷を付与するための媒体として機能しており、免疫学的測定とは異なる新規な使い方に属するものである。

【0020】

【実施例】次に、本発明の実施例について説明する。

実施例1

射出成形した直径35mmのポリスチレン製シャーレを、減圧下で酸素ガスを通気しながら高周波低温プラズマを発生させて3分間処理した後、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン10%メタノール溶液に浸漬し、16時間放置してアミノシラン処理を行い、蒸留水で洗浄し乾燥して、表面のアミノ基密度 1.2nmol/cm^2 の1級アミノシラン化シャーレを得た。これを γ 線により滅菌を施して、培養試験に供した。(尚、アミノ基密度はX線光電子スペクトルにより測定した)

【0021】実施例2

実施例1で得られたアミノシラン処理シャーレを、室温で1年間保存した後、培養試験に供した。

【0022】比較例1

酸素ガス通気下で低温プラズマ処理をした、実施例1と同じポリスチレン製シャーレを、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン1%メタノール溶液に浸漬し、2時間放置してアミノシラン処理を行い、蒸留水で洗浄し乾燥して、表面のアミノ基密度 0.05nmol/cm^2 の1級アミノシラン化シャーレを得、これを γ 線により滅菌を施して、培養試験に供した。

【0023】比較例2

酸素ガス通気下で低温プラズマ処理をした、実施例1と同じポリスチレン製シャーレを、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン25%メタノール溶液に浸漬し、16時間放置してアミノシラン処理を行い、蒸留水で洗浄し乾燥して、アミノ基密度 2.5nmol/cm^2 の1級アミノシラン化シャーレを得、 γ 線により滅菌を施して、培養試験に供した。

【0024】比較例3

射出成形した直径35mmのポリスチレン製シャーレを、減圧下でアンモニアガスを通気しながら高周波低温プラズマを発生させて5分間処理し、基材表面にアミノ基を導入して、培養試験に供した。

【0025】比較例4

住友ベークライト(株)製の培養用シャーレ(MS-10350)に、無菌操作によりポリ-L-リジンの0.01%磷酸緩衝液溶液を2ml入れ、約2時間放置した後、溶液を排出して無菌蒸留水により2回洗浄し、クリーンベチ内で乾燥して得たポリ-L-リジンコートシャーレを培養試験に供した。

【0026】比較例5

比較例4で得られたポリ-L-リジンコートシャーレを、室温で1年間保存した後、培養試験に供した。

比較例6

比較例4で使用した、住友ベークライト(株)製の培養用シャーレ。

【0027】上記の実施例及び比較例の試料シャーレを用いて、下記の方法で、ラット胎児の脳神経細胞の初代培養、神経系の株細胞であるPC12細胞の培養、及びラット肝細胞の初代培養を行い、その形態及び機能を調べた。

【0028】[1] ラット胎児の脳神経細胞の初代培養

10 ラット胎児(16日確定妊娠)より大脳神経細胞を採取し、牛胎児血清10%添加BEM培地中に分散し、35mmシャーレ1枚当たり 2×10^5 個の細胞を播種し、細胞の接着早さ、形態、神経突起の伸長形態、及び長期培養での細胞の生存率を比較評価した。(培地交換は3日毎に行い、培養開始3日目にシトシンアラビノシドを添加した。)

【0029】[2] PC12細胞の培養

20 神経系の株細胞であるPC12細胞を、牛胎児血清10%、馬血清5%添加したダルベッコ変法MEM培地を用いて、35mmシャーレ1枚当たり 2×10^4 個播種し、細胞の初期接着速度、細胞の培養形態、及び神経突起の伸長状態を比較評価した。

【0030】[3] ラット肝細胞の初代培養

4週令ウィスター系ラット雄よりコラゲナーゼ灌流法により肝実質細胞を採取し、牛胎児血清、インシュリン、トランスフェリン、及びデキサメサゾンを添加したウィリアムス培地を用いて、35mmシャーレ当たり 5×10^6 個細胞を播種し、3日毎に培地交換を行い細胞の形態及びアルブミンの合成量を比較評価した。

30 【0031】評価結果は表1～表3に示した通りで、1級アミノシラン化により陽電荷を付与した本発明の培養用器具は、初代培養、神経系細胞の培養において、細胞形態、機能維持が良好であり、かつ長期保存してもその効果が持続していることが明白である。

【0032】

【発明の効果】以上のように、本発明の基材表面を1級アミノシラン化することにより陽電荷を付与した培養用器具は、細胞の初代培養や神経系の細胞の培養において、細胞の機能を長期維持し、又、長期保存においても安定でありその効果が失われることがなく、細胞の初代培養用、特に神経系細胞の培養や肝細胞のような機能性の細胞の培養に好適である。

【0033】

【表1】

表 1 ラット胎児の大脳神経細胞の初代培養

| | シャーレの培養面の処理 | 表面のアミノ基 密度 nmol/cm ² | 細胞の初 期接着率 | 培養 3 日 目の形態 | 神経突起の 伸長度合 | 培養10日目 の生存率 |
|-------------|-------------|------------------------------------|--------------|----------------|---------------|----------------|
| | | | | | | |
| 実 施 例 | 1 | 酸素プラスマ処理 + アミノシラン10%溶液 | 100% | 一様に伸展 + | ++ | 90% |
| | 2 | 酸素プラスマ処理 + アミノ シラン10%溶液(1年保存) | 100 | 一様に伸展 + | ++ | 92 |
| 比 較 例 | 1 | 酸素プラスマ処理 + アミノシラン1%溶液 | 40 | 細胞凝集 - | + | 37 |
| | 2 | 酸素プラスマ処理 + アミノシラン2.5%溶液 | 79 | 細胞凝集 - | + | 65 |
| | 3 | アンモニアプラスマ処理 | 82 | 細胞凝集 - | - | 62 |
| | 4 | ポリ-ε-リジンコート | 100 | 一様に伸展 + | ++ | 85 |
| | 5 | ポリ-ε-リジンコート (1年保存) | 73 | 細胞凝集 - | - | 47 |
| | 6 | - | 35 | 細胞凝集 - | - | 32 |

(注) 細胞の初期接着率は、播種30分における接着率

[0034]

[発2]

表2 PC12細胞の培養

| | | 細胞の初期接着率 | 培養3日目の形態 | 神経突起の伸長度合 |
|-----|---|----------|----------|-----------|
| 実施例 | 1 | 100% | 伸展接着良好++ | ++ |
| | 2 | 100 | 伸展接着良好++ | ++ |
| 比較例 | 1 | 30 | 伸展悪い+- | - |
| | 2 | 80 | やや伸展良 + | + |
| | 3 | 72 | やや伸展悪い+- | - |
| | 4 | 100 | 伸展接着良好++ | ++ |
| | 5 | 65 | やや伸展悪い+- | - |
| | 6 | 25 | 伸展悪い - | - |

(注) 細胞の初期接着率は、播種30分における接着率

【0035】

【表3】

表3 ラット肝細胞の初代培養

| | | 細胞の培養形態 | アルブミン合成量 (5日目) | アルブミン合成量 (10日目) |
|-------------|---|---------|-------------------|--------------------|
| 実 施 例 | 1 | 細胞塊形成 | 95 | 78 |
| | 2 | 細胞塊形成 | 90 | 79 |
| 比 較 例 | 1 | 単 層 | 62 | 30 |
| | 2 | 細胞塊形成 | 93 | 65 |
| | 3 | 細胞塊形成 | 93 | 68 |
| | 4 | 細胞塊形成 | 89 | 65 |
| | 5 | 単 層 | 65 | 40 |
| | 6 | 単 層 | 40 | 27 |

(注) アルブミン合成量は、播種1日目の単位細胞数当りの1日
当りの合成量を100とする指数で示した

